

• 基础实验研究论著 •

白细胞介素 6 对结肠癌 Lovo 细胞细胞周期的影响*

冯秋娟¹, 柯长涛¹, 李妙丹², 李颖欣¹, 程小广^{3△}, 曾今诚^{4▲}

(1. 广东医学院医学检验学院, 广东东莞 523808; 2. 广东医学院第一临床学院, 广东东莞 523808;

3. 广东医学院分析中心, 广东东莞 523808; 4. 广东医学院检验医学研究所, 广东东莞 523808)

摘要:目的 研究白细胞介素 6(IL-6)对结肠癌 Lovo 细胞细胞周期的影响。方法 不同浓度 IL-6 作用 Lovo 细胞 12、24 和 36 h 后, PI 染色检测细胞周期变化, Western blot 检测周期蛋白表达。结果 结肠癌 Lovo 细胞经体外 IL-6 作用后, G0/G1 期细胞数减少, S 期细胞数增加, CyclinD1 表达增加。结论 IL-6 能体外促进结肠癌 Lovo 细胞增殖, 可能与 CyclinD1 表达上调有关。

关键词: 白细胞介素 6; 结肠肿瘤; 细胞周期

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.23.003

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)23-2822-02

The effects of Interleukin-6 on colon cancer cell cycle*

Feng Qiujuan¹, Ke Changtao¹, Li Miaodan², Li Yinxin¹, Chen Xiaoguang^{3△}, Zeng Jincheng^{4▲}

(1. College of Laboratory Medicine, Guangdong Medical College, Guangdong 523808, China; 2. First Clinical College,

Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong 523808, China;

3. Analysis Center, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong 523808, China; 4. Institute of

Laboratory Medicine, Guangdong Medical College, Dongguan, Guangdong 523808, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of IL-6 on the cell cycle of colon cancer Lovo cell in vitro. **Methods** Analyzing the cell cycle of Lovo cell by PI stain and detecting the expression of cyclin by western blot. **Results** After treatment of IL-6 in vitro, the number of cells in G0/G1 phase was reduced, and that of S phase was increased, and the expression of CyclinD1 was increased. **Conclusion** IL-6 in vitro plays role in promoting the proliferation of colon cancer Lovo cell, which may be related to upregulation of CyclinD1.

Key words: interleukin-6; colonic neoplasms; cell cycle

结肠癌是 1 种常见恶性肿瘤, 近年来其发病率逐年上升, 且发病年龄也明显提前。研究表明炎性肠病与结肠癌发病密切相关^[1]。白细胞介素 6(IL-6)作为前炎性细胞因子, 被认为在促进细胞生长、增殖和抗细胞凋亡机制中起重要作用^[2]。临床研究发现结肠癌患者血清和癌组织中 IL-6 水平增高, 且 IL-6 浓度与肿瘤大小、转移、预后和生存率相关^[3-4]。结果提示 IL-6 可能与结肠癌发病有关。所以本实验为在研究 IL-6 对体外细胞周期及相关周期蛋白表达的影响, 从而为深入探讨 IL-6 与结肠癌的发生关系提供实验资料。

1 材料与方法

1.1 材料 结肠癌 Lovo 细胞由广东医学院检验医学研究所提供, DMEM 培养基(美国 Gibco)、胰酶细胞消化液(含 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA)、新生小牛血清(杭州四季青)、重组人 IL-6、碘化丙啶(PI)(美国 Sigma)、Actin 抗体(碧云天生物技术研究所)、蛋白提取试剂盒(北京普利莱)、CyclinD1 抗体(美国 Santa Cruz)、辣根过氧化物酶标记二抗(武汉博士德)、微量蛋白超级信号检测试剂盒(美国 Thermo)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 结肠癌 Lovo 细胞培养于 10% 小牛血清 DMEM 培养基, 37℃, 5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养。每 2 天换液 1 次, 0.25% 的胰蛋白酶消化、传代。取对数生长期

细胞进行后续实验。

1.2.2 流式细胞仪检测细胞周期 对数生长期 Lovo 细胞以 5×10^5 /mL 接种于 6 孔板, 待细胞完全贴壁后, 不同终浓度 IL-6(0、1、5、10、15、20 ng/mL)作用细胞不同时间(12、24、36 h)后, 胰酶消化收集细胞, 每组设 3 个复孔, PBS 洗涤, 加入 PI 染液, 避光静置染色 30 min, 经 100 目尼龙网过滤后, 用流式仪进行周期检测。

1.2.3 Western blotting 检测周期蛋白表达 采用蛋白提取试剂盒提取上述相同方法分组细胞总蛋白, 蛋白样品经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并电转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶 4℃ 封闭过夜后加入 CyclinD1 抗体(工作浓度 1:1 000), 室温孵育 1 h 后加入酶标记二抗(工作浓度 1:5 000), 室温孵育 1 h 后微量蛋白超级信号检测试剂盒检测杂交信号, 暗室曝光; 以 Actin 蛋白为内对照, Image J 条带分析软件扫描条带, 每组重复 3 次实验后进行统计学分析。

1.3 统计学处理 SPSS17.0 统计学分析软件对各组数据进行单因素方差分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 假设检验显著性水平取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 IL-6 诱导 S 期细胞增加 流式细胞仪检测 IL-6 作用结肠癌 Lovo 细胞不同时间后细胞所处于不同周期时象的百分比

* 基金项目: 广东医学院青年基金(Q2011004); 广东医学院大学生创新实验项目(2010ZYDC004)。△ 通讯作者, E-mail: duquan2007@

163.com。▲ 通讯作者, E-mail: zengjincheng83@126.com。

见表 1。IL-6 作用 12 h 后,即可引起细胞周期的明显变化,表现为 G0/G1 期细胞数减少,S 期细胞数增加。12、24、36 h 组与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1、图 1。

表 1 IL-6 不同作用时间对 Lovo 细胞周期的影响 (%)

组别	G0/G1 期	S 期	G2/M 期
对照组	51.7±1.4	29.4±2.1	18.9±2.7
12 h 组	45.5±2.3*	34.3±1.8*	20.2±1.4
24 h 组	31.1±1.6**	48.5±1.9**	20.4±1.1
36 h 组	40.8±3.2**	39.6±2.4**	19.6±2.10

*: $P<0.05$; **: $P<0.01$, 与对照组比较。

2.2 CyclinD1 蛋白检测 Western blotting 检测 IL-6 不同作用时间后,Cyclin D1 蛋白表达随着作用时间延长逐渐增强,各组相对表达量与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1。

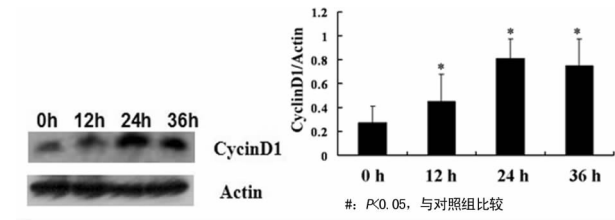


图 1 IL-6 对 Cyclin D1 蛋白表达的影响

3 讨 论

IL-6 是 1 种分子量为 21×10^3 的糖蛋白,人 IL-6 基因定位于第 7 号染色体上,含有 5 个外显子和 4 个内含子。人 IL-6 主要由单核巨噬细胞、内皮细胞及淋巴细胞产生,是 1 种多效应细胞因子。在炎症、坏死或肿瘤细胞抗原刺激均可引起免疫细胞分泌 IL-6,使患者血清中 IL-6 增加^[5]。研究发现,结肠癌患者血清 IL-6 水平显著升高,并与肿瘤复发及预后相关^[3-4]。IL-6 可通过正调节抗凋亡和促血管形成蛋白促进肿瘤的生长,在鼠类实验中也证实 IL-6 抗体可抑制肿瘤生长。在培养的结肠癌 SW-480 细胞中加入 IL-6(10 ng/mL)可明显增加软琼脂细胞集落,增强肿瘤细胞趋化及肿瘤细胞对基底膜的浸润能力,说明 IL-6 对结直肠癌的进展有重要作用^[6]。本实验发现 IL-6 能促进结肠癌 Lovo 细胞从 G0/G1 期进入 S 期,进而促进肿瘤细胞增殖,证实体外 IL-6 能促进结肠癌细胞的生长。

多数观点认为肿瘤是一类细胞周期性疾病。以 cyclins/CDKs/CKI/pRb 为核心的 G1/S 期细胞周期网络调控系统,是肿瘤发生中最常改变的共同通路^[7]。因此,调控 G1/S 期限制点的多个细胞周期调节因子,尤其是细胞周期蛋白 D1(CyclinD1),成了控制肿瘤细胞周期的靶点。CyclinD1 是 1 种原癌基因产物,也是一种生长因子感受器。研究发现多肿瘤中 CyclinD1 呈过表达。本实验中检测的对照组细胞(未经 IL-6 处理组)表达一定量的 CyclinD1,经 IL-6 处理后的结肠癌 lovo 细胞 CyclinD1 表达增高,且其与周期变化的趋势相同。Cyclin D1 主要作用于 G1 期,控制着 G1/S 期进程速度,CycinD1 过表达可致细胞 G1 期缩短^[8],这与本实验检测到的细胞周期变化相符,提示 IL-6 可能通过促进 CyclinD1 过表达来促进结肠癌细胞增殖。

胞内 IL-6 主要通过与其受体 IL-6R 结合,活化胞内一系列信号蛋白分子发挥作用。近年来研究证明,IL-6/IL-6R 介导

的信号通路参与了肿瘤细胞的细胞周期调控。在小鼠脑肿瘤模型中,IL-6 信号通路阻断,可限制小鼠脑肿瘤发展^[9]。进一步研究发现,IL-6 通过 IL-6/STAT3 信号通路,可促进星形胶质细胞生长。在 JAK/STAT 信号通路中,STAT3 过度激活会表现出对肿瘤的促进作用,它的转录活性是调节细胞生长、增殖、血管生成和肿瘤诱导的免疫抑制等作用的先决条件^[10]。同时,STAT3 是 gp130 介导的细胞存活和 G1 期到 S 期细胞信号传导的一个重要分子。CyclinD1 是 STAT3 下游信号途径中的一个重要的调控基因,IL-6 可能是通过 JAKS-STAT 信号途径促进 CyclinD1 过表达加速细胞周期的进程,从而促进结肠癌细胞增殖。目前研究还表明 IL-6 与 IL-6R 结合后还可通过 Ras/Erk 和 PI3K 介导的信号通路作用于相关细胞,这 2 条信号通路是否与 CyclinD1 相关及 IL-6 是否通过 JAKS-STAT 信号途径促进 cyclinD1 表达的确切机制仍需进一步研究。

总而言之,实验表明 IL-6 在体外能促进结肠癌细胞的增殖,其作用过程可能与诱导 CyclinD1 蛋白表达相关。因此,控制肿瘤局部 IL-6 水平及其受体有望成为治疗结肠癌的一项手段。

参考文献

[1] Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation[J]. Nature, 2008, 454(7203): 436-444.

[2] Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2002, 13(4/5): 357- 368.

[3] Belluco C, Nitti D, Frantz M, et al. Interleukin-6 blood level is associated with circulating carcinoembryonic antigen and prognosis in patients with colorectal cancer[J]. Ann Surg Oncol, 2000, 7 (2): 133-138.

[4] Galizia G, Orditura M, Liomauo C, et al. Prognostic significance of circulating IL-10 and IL-6 serum levels in colon cancer patients undergoing surgery[J]. Clin Immunol, 2002, 102(2): 169-178.

[5] 史继静, 刘朝奇. 白介素 6 与肿瘤相关性的研究进展[J]. 生命的化学, 2008, 28(1): 12-14.

[6] Hsu CP, Chung YC. Influence of interleukin-6 on the invasiveness of human colorectal carcinoma[J]. Anticancer Res, 2006, 26(6B): 4607-4614.

[7] Bartek J, Lukas J, Bartkova J. Perspective defects in cell cycle control and cancer[J]. J Pathol, 1999, 187(1): 95-99.

[8] Wu J, Wu SH, Bollig A, et al. Identification of the cyclinD1b mRNA variant in mouse[J]. Mol Biol Rep, 2009, 36(5): 953-957.

[9] Weissenberger J, Loeffler S, Kappeler A, et al. IL6 is required for glioma development in a mouse model [J]. Oncogene, 2004, 23 (19): 3308-3316.

[10] Bollrath J, Phesse TJ, von Burstin VA, et al. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis[J]. Cancer Cell, 2009, 15(2): 91-102.

(收稿日期: 2012-08-12)